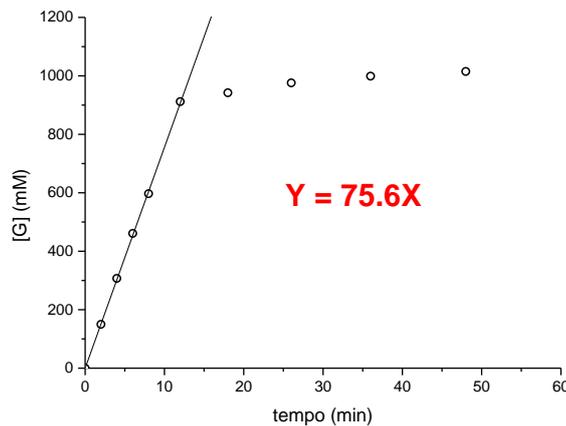


# PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016

## N. 1 Catalisi enzimatica: Analisi dei dati cinetici

- 1) La  $\beta$ -galattosidasi ( $\beta$ -D-galactoside galactoidrolasi, EC 3.2.123) [<http://www.brenda-enzymes.info/>] catalizza l'idrolisi del lattosio in glucosio e galattosio ed è ampiamente utilizzata nella produzione di latte "HD". Un preparato liquido commerciale da *Kluyveromyces marxianus var lactis* deve essere impiegato in ragione di 500 IU per litro di latte per ridurre dell'80% il tenore di lattosio. Determinare il dosaggio opportuno (mL di preparato per litro di latte). L'analitica prevede l'impiego di HPLC/RI per determinare il glucosio. Si aggiungono 0.3 mL di preparato diluito 1:3 a una soluzione di lattosio 1500 g/L incubando a 35 °C e pH 6.4. I prelievi, raccolti a tempi di reazione diversi, sono bolliti per disattivare l'enzima, filtrati e mandati all'analisi. I risultati sono:

t, min	0	2	4	6	8	12	18	26	36	48
[G], mM	0	150	307	461	597	912	942	976	999	1015



*Dalla porzione lineare del diagramma si stima l'attività specifica dell'enzima, tenuto conto della diluizione e della stechiometria 1:1.*

$$\text{attività} = 75.6 \left[ \frac{\mu\text{moliG}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right] \frac{1.5}{0.3} = 1134 \left[ \frac{\mu\text{moliG}}{\text{mL}_E \cdot \text{min}} \right] = 1134 \left[ \frac{\text{IU}}{\text{mL}_E} \right]$$

*La concentrazione iniziale di lattosio è  $1500 \times 1.2 \times 1.5^{-1} = 1200 \text{ g L}^{-1}$  (3500 mM): verosimilmente saturante. Ne consegue che la velocità di reazione iniziale misurata rappresenta effettivamente l'attività.*

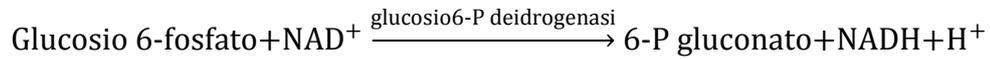
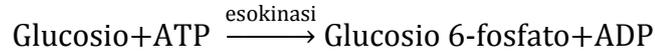
*Il dosaggio dovrà pertanto essere:*

$$\text{dose} = \frac{500 \left[ \frac{\text{IU}}{\text{L}_{\text{Latte}}} \right]}{1134 \left[ \frac{\text{IU}}{\text{mL}_E} \right]} = 0.44 \left[ \frac{\text{mL}_E}{\text{L}_{\text{Latte}}} \right]$$

# PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA

## ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016

- 2) Una ditta produttrice di glucoamilasi dichiara per il proprio prodotto un'attività di 0.033 katal/L. Per verificare il dato, l'attività viene saggiata su maltosio (maltosio + H<sub>2</sub>O → 2glucosio) mediante un kit che determina il glucosio secondo lo schema:



Il NADH viene determinato per spettrofotometria misurando la OD a 340 nm: il coefficiente di estinzione è 90 mL/(cm mmol). I saggi sono condotti con il preparato diluito e impiegando eccesso di ATP e NAD<sup>+</sup> (*perché?*).

Tempo di reazione, min	(OD) <sub>340nm</sub>	
	D = 1:1500	D = 1:7500
0	0.030	0.005
1	0.259	0.056
2	0.542	0.107
3	0.800	0.159
4	0.905	0.210
5	0.943	0.261

*In base alla legge di Lambert-Beer:*

$$(\text{OD})_{\lambda} = \epsilon L [C]$$

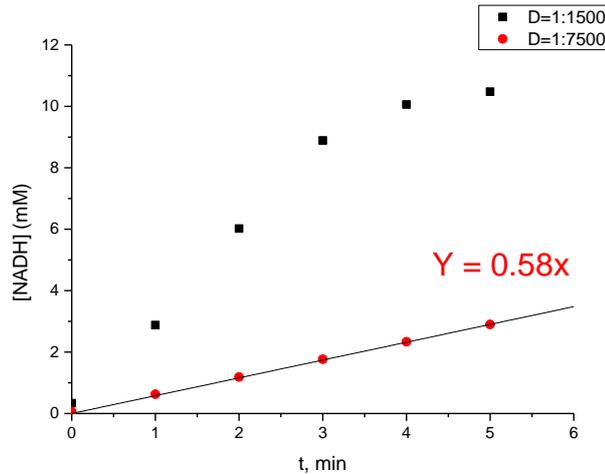
*Quindi:*

$$[\text{NADH}] = \frac{(\text{OD})_{340}}{90 \times 1} \times 1000 \quad [\text{mM}]$$

*I dati ottenuti corrispondono pertanto a:*

Tempo di reazione, min	[NADH], mM	
	D = 1:1500	D = 1:7500
0	0.333	0.056
1	2.878	0.626
2	6.022	1.189
3	8.889	1.767
4	10.06	2.333
5	10.48	2.900

# PRINCIPI DI INGEGNERIA BIOCHIMICA ESERCITAZIONI NUMERICHE A.A. 2015-2016



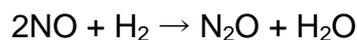
$$\text{Attività} = 0.58 \times 7500 = 4350 \left[ \frac{\mu\text{mol G}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right]$$

$$\text{Attività} = \frac{4350}{2} = 2175 \left[ \frac{\mu\text{mol maltosio}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right] = 2175 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}$$

$$\text{Attività} = \frac{2175}{10^6 \cdot 60} = 3.625 \cdot 10^{-5} \left[ \frac{\text{katal}}{\text{mL}} \right]$$

*L'attività misurata è circa il 10% più alta di quella dichiarata dal produttore.*

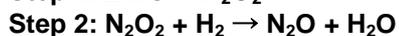
- 3) Utilizzando l'approssimazione di stato quasi-stazionario pervenire all'equazione cinetica costitutiva per la reazione:



Le possibili reazioni elementari sono:



**costanti:**  $k_1$ , diretta;  $k_{-1}$ , inversa



**costante:**  $k_2$

- 4) Per la reazione del primo ordine  $A \rightarrow B + C$  la costante cinetica vale  $1.43 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  e la concentrazione iniziale di A è 0.567 M. Quale sarà la concentrazione di A 2.5 minuti dopo? (0.0664 M).
- 5) Mostrate come sia possibile ottenere un'equazione lineare da leggi cinetiche di primo, secondo e terzo ordine.
- 6) A 25 °C una reazione aumenta di 1500000 volte la sua velocità se catalizzata da un enzima. Determinare il decremento di energia di attivazione causato dalla aggiunta di biocatalizzatore.